

Artigo

Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como Foco

Pita, S. S. da R.;* Pascutti, P. G.

Rev. Virtual Quim., 2011, 3 (4), 307-324. Data de publicação na Web: 28 de outubro de 2011

<http://www.uff.br/rvq>

Therapeutic Targets in Chagas' Disease: a Focus on Trypanothione Reductase

Abstract: The work of Carlos Chagas culminated with the description of the disease that bears his name. His discovery reaches over a century. Since the first reports of this disease, many therapeutic approaches have been developed intending treatment of the disease. However, to date, none therapy has proven to be enough to cure the acute and chronic disease's manifestations without severe adverse effects.

Several approaches relying on modern techniques including rational drug design from a potent prototype compound, have achieved relative success. Different routes are used which the main objective is the development of an effective therapy suitable for populations economically disadvantaged. This mini-review highlights some classes of these therapies, mostly in the experimental stage, and discusses many approaches to enzyme inhibition of the protozoan that have proved promising in the fight against Chagas' disease. The specific focus is the enzyme trypanothione reductase.

Keywords: Chagas' Disease; Chagas' Disease Therapy; Trypanothione Reductase.

Resumo

Os trabalhos de Carlos Chagas que culminaram com a descrição da enfermidade que leva seu nome datam de mais de um século. Desde os primeiros relatos desta doença inúmeras abordagens terapêuticas buscaram seu tratamento. Contudo, até o momento nenhuma terapia revelou-se suficiente para combater as manifestações agudas e crônicas desta doença sem apresentar severos efeitos adversos.

Diversas abordagens terapêuticas apoiando-se em modernas técnicas, inclusive no planejamento racional de fármacos, a partir de um potente composto protótipo têm obtido relativo sucesso. Diferentes vias metabólicas do parasito são utilizadas pretendendo-se o desenvolvimento de uma terapia mais apta a ser utilizada em populações economicamente carentes. Esta mini-revisão traz à luz algumas destas terapias, a maioria na fase experimental, e discute algumas abordagens de inibição enzimática do protozoário que se revelaram promissoras no combate a doença de Chagas. O foco específico é a enzima Tripanotiona Redutase.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Terapia da doença de Chagas; Tripanotiona Redutase.

*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 393, Centro de Ciências da Saúde, Bloco D, sala 30, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ samuelpita@biof.ufrj.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20110035](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110035)

Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como Foco

Samuel S. da R. Pita,^{a,b,*} Pedro G. Pascutti^a

^aAv. Carlos Chagas Filho, 393, Centro de Ciências da Saúde, Bloco D, sala 30, Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM), Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP: 21941-902, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro- RJ- Brasil.

^bAv. Barão de Geremoabo, 147, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM), Cidade Universitária, Ondina, CEP: 40170-115, Universidade Federal da Bahia- Salvador- BA- Brasil.

*samuelpita@biof.ufrj.br

Recebido em 29 de agosto de 2011. Aceito para publicação em 24 de outubro de 2011

1. Panorama Global das Doenças Negligenciadas
2. Histórico da doença de Chagas
3. Terapêutica da doença de Chagas
4. Alvos para o Desenvolvimento de Fármacos contra a doença de Chagas
 - 4.1. A enzima Tripanotiona Redutase
 - 4.2. Outros Alvos Enzimáticos do T. cruzi
5. Conclusões



1. Panorama Global das Doenças Negligenciadas

A Declaração do Milênio assinada em setembro de 2000 pelos líderes mundiais das Nações Unidas estabelecia uma lista de metas visando a eliminação da extrema pobreza, fome e doença no mundo até o ano de 2015.¹ A 6ª meta consistia em “**combater o HIV-AIDS, malária e outras doenças**” e direcionava-se especificamente ao impacto econômico e de saúde das doenças negligenciadas.¹ Por doenças negligenciadas entende-se enfermidades que afetam bilhões de pessoas nas partes mais pobres do mundo.² Planos governamentais para combater a AIDS, Tuberculose e Malária são notórios e dentre estes destacam-se:^{1,3} o Plano Norte-Americano Presidencial Emergencial para a AIDS [U.S. President's Emergency Plan for AIDS Relief], a Iniciativa Norte-

Americana Presidencial contra Malária [U.S. President's Malaria Initiative], o Fundo Global de Combate a AIDS, Tuberculose e Malária e a Venture de Medicamentos para a Malária (MMV).

Contudo, programas para combater as “**outras doenças**” explicitadas na 6ª meta e, em particular, doenças tropicais negligenciadas, ainda não atingiram o mesmo aporte de recursos.¹ Entre algumas das iniciativas globais de colaboração científica com o papel de criar, apoiar, integrar e coordenar esforços e diminuir o impacto econômico e social das doenças negligenciadas se destacam: a Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas (**DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative**), o Instituto de Saúde do Primeiro Mundo (**iOWH – initiative One World Health**) e a Organização Mundial de Saúde através de seu Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (**WHO/TDR – World Health Organization/Special Programme for Research &**

Training in Tropical Diseases Research). Fundado em 1975, o TDR é patrocinado por um grupo formado pelo Fundo Infantil das Nações Unidas (**UNICEF** - *The United Nations Children's Fund*), Nações Unidas para o Desenvolvimento (**UNDP** - *United Nations Development Programme*), Banco Mundial (*The World Bank*) e OMS. Este programa especial possui a participação do Brasil ao abarcar as redes: de triagem de compostos (*compound screening network*), de identificação de alvos (*drug target network*), de farmacocinética e metabolismo de fármacos (*drug metabolism and pharmacokinetics network*), e de química medicinal (*medicinal chemistry network*).⁴

As treze infecções mais comumente conhecidas como doenças tropicais negligenciadas estão listadas na **Tabela** e sua abrangência global é apresentada na **Figura**. Estas doenças afetam, em sua maior parte, indivíduos em situação de pobreza resultando em incapacidade física a longo prazo.¹

Algumas observações importantes podem ser obtidas a partir da interpretação da **Tabela** e da **Figura**:

- i. Existem extensas sobreposições geográficas e coendemicidade nessas doenças;
- ii. As populações de cada região são infectadas com

diferentes parasitos ou apresentam simultaneamente múltiplas doenças negligenciadas.¹

Por si só, este último fator deveria fundamentar a busca de agentes terapêuticos mais eficazes no combate as doenças negligenciadas, contudo certos fatores contribuem para que esta procura apresente entraves do tipo: o desgaste socioeconômico dessas populações,³ a alta taxa de mortalidade dessas doenças,³ e, a baixa perspectiva de retorno financeiro às indústrias fármaco-químicas.⁵

Tomados em conjunto, estes fatores resultam no dado de que menos de **1%** de todas as novas drogas desenvolvidas nos últimos **30 anos** visam o tratamento das doenças tropicais.^{6,7}

Essas décadas de obsolescência terapêutica concomitante ao maciço problema de saúde que as doenças negligenciadas representam, têm requisitado demasiados esforços no âmbito do desenvolvimento de fármacos.³ Por não serem alvos farmacêuticos prioritários, os financiamentos para a pesquisa básica das doenças negligenciadas são canalizados a outras enfermidades de menor prevalência, mas, com impacto mais direto na América do Norte e na Europa.³

Tabela 1. Lista das 13 maiores Doenças Tropicais Negligenciadas classificadas quanto a sua prevalência¹

Doença	Prevalência Global (milhões)	População em Risco	Regiões de Prevalência
Ascaridíase	807	4,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, China, América Latina e Caribe
Tricuríase	604	3,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Ancilostomose	576	3,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Esquistossomíase	207	779 milhões	África Subsaariana, América Latina e Caribe
Filariose Linfática	120	1,3 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana
Tracoma	84	590 milhões	Meio-Leste e Norte Africano, África Subsaariana
Oncocercose	37	90 milhões	África Subsaariana, América Latina e Caribe
Leishmaniose	12	350 milhões	Sul Asiático, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Doença de Chagas	8-9	25 milhões	América Latina e Caribe
Hanseníase	0,4	Não Determinada	África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Tripanossomíase Africana	0,3	60 milhões	África Subsaariana
Dracunculíase	0,01	Não Determinada	África Subsaariana
Úlcera de Buruli	Não Determinada	Não Determinada	África Subsaariana

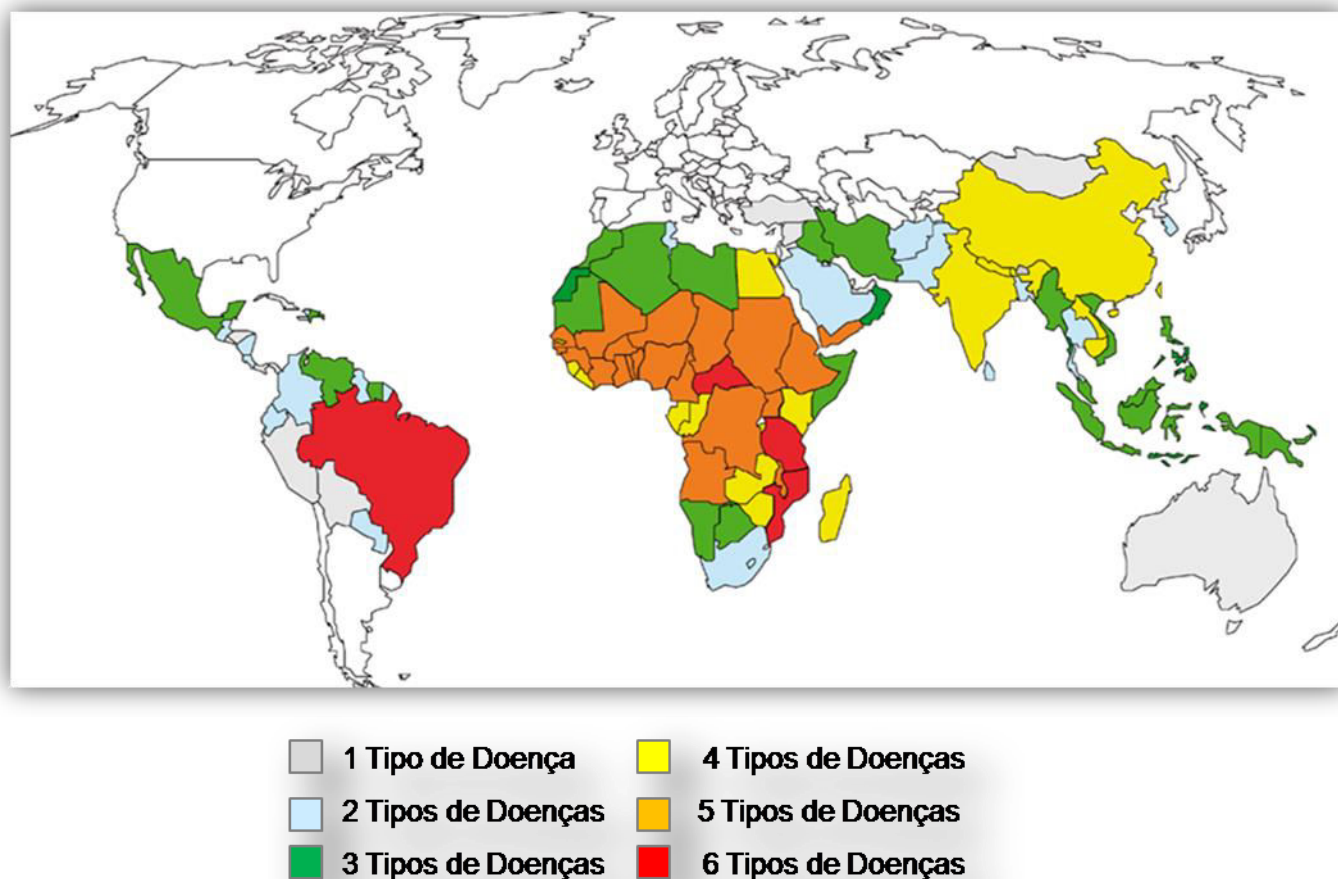


Figura 1. mapa de sobreposição geográfica das doenças tropicais negligenciadas⁸ conforme expressas na Tabela.

Em resposta a esse quadro, parcerias como a criação de centros acadêmicos, a formação de entidades sem fins-lucrativos^{1,3} ou o Programa de Terapia para Doenças Raras e Negligenciadas (TRND)-um fundo quinquenal de 24 milhões de dólares anuais- tem sido especificamente endereçadas ao desenvolvimento de fármacos para as doenças negligenciadas. Entretanto, existem aspectos peculiares no processo de desenvolvimento de fármacos para essas enfermidades, tais como:

- i. Baixo custo de produção;³
- ii. Alta biodisponibilidade por via oral;³
- iii. As reações adversas ao tratamento serem toleráveis;^{3,9}
- iv. Possibilidade de administração com outras drogas;³
- v. Efetividade em poucas doses;⁹
- vi. Promoção da cura parasitológica em casos agudos e crônicos;⁹
- vii. Não haver necessidade de hospitalização para sua administração.⁹

A fase atual da terapia das doenças negligenciadas contrasta com a doença de Chagas, ou mais especificamente, o controle dos seus vetores, cujas atividades datam de 1940.¹⁰ Este, encontra-se bem estabelecido desde a década de 70,¹¹ num esforço coordenado pelos países do Sul da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) conhecido como **Iniciativa do Cone Sul** e apoiado pela Organização Mundial da Saúde. Um proeminente resultado desta iniciativa foi a interrupção, ou a drástica redução, da transmissão do parasito pelo inseto em extensas áreas, como:¹²

- 1) Uruguai (país) 1997;
- 2) Chile (país) 1999;
- 3) Brasil (seis estados) 2000;
- 4) Brasil (dois estados) 2001;
- 5) Argentina (quatro províncias) e Brasil (dois estados), 2002;
- 6) Paraguai (um departamento), 2003;
- 7) Argentina (duas províncias) e Brasil (dois estados), 2004;

8) Brasil (um estado), 2005. No ano de 2006 o Brasil atingiu o patamar de país livre da transmissão pelo inseto.¹³

O resultado deste controle da transmissão demonstra dentre outros fatores:¹⁴ o comprometimento dos sucessivos governos desses países com a eliminação dessa doença; os claros objetivos estabelecidos para atingir a eliminação da transmissão; os programas de doação de fármacos (ou inseticidas); as pesquisas estratégicas inseridas nos programas particulares de erradicação; e a ausência de resistência química (inseticidas ou fármacos) nos organismos-alvo.

Contudo apesar dos esforços envidados no controle dos vetores, a necessidade de um maior controle terapêutico da doença de Chagas veio à tona, uma vez que micro epidemias recentes tem ocorrido sob diversas formas: devido à ingestão dos parasitos em alimentos (alimentos contaminados com parasitos)¹⁵⁻¹⁸; através da transmissão congênita;¹⁹ pela contaminação de habitantes do país devida a fluxos migratórios;²⁰⁻²⁴ por intermédio de modos pouco convencionais de infecção (sexual, drogas injetáveis, etc.);²⁵ ou devido a pacientes imunocomprometidos pelo HIV serem coinfetados pelo *Trypanosoma cruzi*.¹³

Se analisados conjuntamente, os dados epidemiológicos e os casos de recentes contaminações, ambos remetem a conclusão de que a doença de Chagas não é mais uma doença endêmica, transmitida por insetos e localmente confinada em áreas rurais, mas sim, uma doença urbana com novos meios de transmissão, globalizados e com potencial para se tornar uma ameaça internacional.^{13,26}

Neste âmbito, a presente revisão discute sucintamente alguns aspectos da doença de Chagas até seu centenário, comemorado em 2009, e aponta certas estratégias promissoras para o tratamento farmacológico desta enfermidade através da inibição de enzimas do protozoário.

2. Histórico da doença de Chagas

Desde sua descoberta em 1909,^{27,28} a doença de Chagas tem afligido diversas populações de diferentes países, sendo endêmica no continente americano cuja abrangência estende-se do sul da região dos grandes lagos na América do Norte ($\approx 46^\circ\text{N}$) ao sul da Patagônia ($\approx 46^\circ\text{S}$).²⁹ O agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário flagelado pertencente a

ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum* e espécie *T. cruzi*. Esta ordem filogenética abarca ainda protozoários do gênero *Leishmania* (também patogênico ao homem) e a *Crithidia fasciculata* (parasito de insetos, não-patogênico aos seres humanos e modelo para os estudos de tripanossomatídeos).³⁰

De um modo geral, a descrição completa do ciclo de vida do *T. cruzi* foi elucidada há 100 anos.²⁷ Contudo, permanecem divergências sobre as formas de desenvolvimento deste protozoário.³¹ Sabe-se que o ciclo de vida do *T. cruzi* envolve mais de um estágio morfológico distinto³² (**Figura**).

Os insetos hematófagos (sub-família *Triatominae*) são responsáveis pela transmissão da doença de Chagas para os hospedeiros mamíferos. Após o repasto sanguíneo, estes insetos depositam suas fezes contendo as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do protozoário próximo ao orifício usado para a sucção. Existem mais de 100 espécies de insetos triatomíneos no continente americano e muitos desses são responsáveis pela manutenção do ciclo selvático da doença. No Brasil, os vetores mais importantes para a doença de Chagas são: *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*.³²

A entrada dos protozoários nas formas metacíclicas por lesões na pele ou através de mucosas resulta em posterior invasão de células do hospedeiro, tais como macrófagos, fibroblastos e células musculares estriadas e lisas.^{28,33} No sangue periférico dos hospedeiros mamíferos, as formas tripomastigotas são compostas de duas populações pleomórficas principais: a alongada e a arredondada.³¹ Após a invasão celular, as formas tripomastigotas, em todas as cepas, são englobadas no vacúolo parasitóforo, onde, são internalizados, permanecendo um período, para, em seguida, se diferenciarem à forma amastigota,²⁸ sendo posteriormente liberadas (**Figura**).

A forma amastigota é a responsável pela proliferação intracelular do parasito^{28,31} e, após alguns ciclos de replicação, estas se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas, que são liberadas, podendo atingir a corrente sanguínea após a ruptura celular. Devido a sua motilidade, as formas tripomastigotas são capazes de infectar outras células ou tecidos, fechando o ciclo quando um triatomíneo não infectado fizer seu repasto sanguíneo (**Figura**).

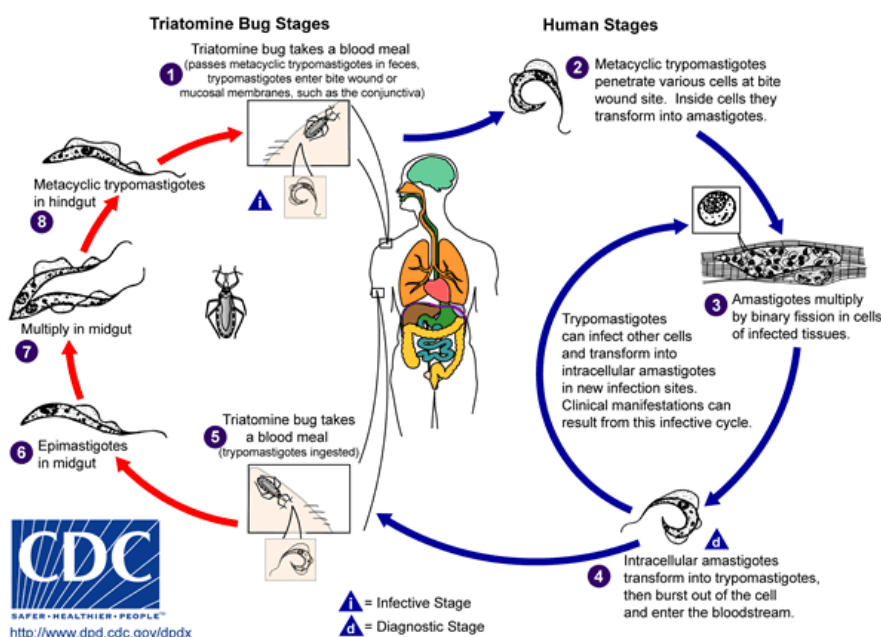


Figura 2. Ciclo Biológico do *T. cruzi*

(Reprodução de http://www.cdc.gov/parasites/images/chagas/AmerTryp_LifeCycle.gif).

As três fases principais da doença de Chagas são definidas como manifestações agudas, indeterminada e crônica da doença. Em seres humanos, a fase aguda inicia-se após a infecção, compreendendo um período de incubação dos protozoários, onde os sintomas persistem por cerca de dois meses, havendo, especialmente em crianças,⁹ uma taxa de mortalidade entre 2 e 8% dos casos. Essa fase caracteriza-se por alta parasitemia sanguínea e invasão de diversos tecidos, incluindo, eventualmente, o tecido nervoso.^{9,28} A primeira reação do sistema imunológico ao *T. cruzi* é uma inflamação mononuclear local devido à ruptura das células parasitadas, sendo que outras reações inflamatórias podem ocorrer.⁹

A despeito da forte reação imunológica⁹ que diminui a parasitemia sanguínea²⁸ após a fase aguda, o protozoário tende a não ser eliminado. Segue-se uma infecção de novas células na qual, entre 20 e 50% dos pacientes⁹ apresentam-se assintomáticos, caracterizando a fase indeterminada da doença,²⁸ ocorrendo após 10 a 20 anos da infecção.³⁴ A manifestação posterior de sintomas cardíacos, digestivos e neurológicos atribuídos a reações de hipersensibilidade aos parasitos⁹ caracteriza a fase crônica da doença, sendo estas aparições clínicas responsáveis também pela morbidade.^{28,34}

3. Terapêutica da doença de Chagas

Sendo uma enfermidade cujo relato científico faz-

se centenário, a doença de Chagas possui, desde seus primórdios, uma história de tentativas de controle terapêutico. Essas experiências são divididas historicamente em três fases:⁴

- I. 1909-1935. Neste momento apenas dois trabalhos, e com resultados insatisfatórios, foram publicados voltados à terapia da doença.⁴
- II. 1936-1960. Corresponde a avaliação de inúmeras substâncias químicas (mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos), extratos e misturas de componentes com resultados controversos e clinicamente questionáveis contra o *T. cruzi*.⁴ Destes, destaca-se o **violeta de genciana** (Figura 3) atualmente ainda utilizado como agente profilático nos bancos de sangue.⁴
- III. 1961-Até o presente. Nesta fase os estudos demonstram claramente, em modelos experimentais de infecção em camundongos, a eficácia de certos compostos. Surgem também os fármacos empregados na clínica para o tratamento da doença de Chagas: o **nifurtimox** lançado em 1967 e produzido pela Bayer (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) e o **benzonidazol** manufaturado pela Roche a partir de 1972 (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 3).



Figura 1. Estruturas químicas dos compostos citados no texto. O violeta de Genciana é um composto usado na quimioprofilaxia dos bancos de sangue em regiões endêmicas (acima). Benzonidazol e nifurtimox são fármacos usadas na terapia da fase aguda da Doença de Chagas (abaixo)

Ambos os fármacos apresentam eficiência terapêutica limitada, devido: à resistência de algumas cepas;⁶ à diferença de susceptibilidade ao tratamento entre indivíduos,⁶ a qual é afetada pela idade do paciente e por sua região endêmica;^{6,9} à fase clínica da doença onde são administrados, sendo ambos mais ativos na fase aguda;²⁹ a dose e da duração do tratamento; às reações adversas, tais como:⁹ anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, manifestações digestivas, sonolência ou excitação, náuseas, vômitos, diarreia, hipersensibilidade, dermatite, linfadenopatia. Devido a magnitude desses efeitos adversos, desde 1980, o nifurtimox teve sua comercialização descontinuada nos países do Cone Sul,⁹ enquanto que o benzonidazol continua a ser usado na fase aguda da doença.

Devido a pouca eficácia da (mono) terapia no combate ao *T. cruzi* e acrescentando-se a este fato a elevada incapacitação e a significativa perda econômica de mão de obra nos países afetados pela doença de Chagas, há a patente necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta doença.³ Esse desenvolvimento deve ser focado no auxílio do controle, na prevenção e na evolução a formas crônicas da doença de Chagas.^{5,6} Assim, as mais diversas classes de compostos têm sido testadas contra o parasito, sendo algumas destas descritas em artigos de revisão anteriores^{5,9,35-37}. Ademais, nos últimos anos, os químicos medicinais têm empregado o planejamento racional para o desenvolvimento de novos candidatos anti-*T. cruzi*, o que, em tese, poderá incrementar o número de protótipos promissores.³⁶

Enquanto a população de indivíduos com doença de Chagas aguarda o desenvolvimento de novos quimioterápicos mais eficientes e de menor toxicidade para a eliminação do *T. cruzi*,³⁸ surgem estratégias, além da fármaco-química tradicional,

focando a tentativa de reparar ou diminuir os danos causados ao miocárdio de pacientes com a forma crônica cardíaca. Este procedimento utiliza-se do transplante de células de medula óssea³⁸ e pode levar à melhora funcional e da qualidade de vida tanto em modelos experimentais,^{39,40} quanto nos pacientes chagásicos.^{41,42}

4. Alvos para o Desenvolvimento de Fármacos contra a Doença de Chagas

A análise genômica e proteômica do protozoário causador da doença de Chagas, *T. cruzi*,^{33,43} datam de 2005.³⁰ Nestes estudos, houve concomitante análise dos genes e das proteínas celulares presentes em outros tripanossomatídeos patogênicos.^{33,43} Estas determinações revelaram novos alvos terapêuticos hipotéticos para o tratamento da doença, como a *trans*-sialidase, a histidina amônio-liase e a urocano hidratase (enzimas capazes de converter histidina a glutamato no metabolismo do parasito).^{33,43} Estas enzimas tiveram sua importância retomada uma vez que o tratamento quimioterápico convencional e as vacinas existentes são praticamente ineficazes.^{5,30,44,45} Além disso, algumas destas enzimas, principalmente as de reações de oxidação-redução, são expressas, predominantemente, na forma tripomastigota metacíclica,³³ o que torna a rota bioquímica viável à quimioterapia.

A remoção de peróxidos tóxicos e a manutenção do nível de tiol intracelular, fundamentais para as reações de oxidação-redução, dependem de um sistema constituído de um conjugado glutationa-espermidina (Figura 4).⁴⁵ Este conjugado é produzido por enzimas do metabolismo da síntese de poliaminas, sendo únicas em alguns parasitos,⁴⁴

tornando-os particularmente vulneráveis quando estas enzimas são bloqueadas. Dos conjugados poliamínicos pertencentes, exclusivamente, aos tripanossomatídeos (*Leishmania sp.*, *Trypanosoma sp.* e *Crithidia fasciculata*), a espermidina conjugada a

duas moléculas de glutathiona (GSH), denominada tripanotiona (TS₂, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), recebeu especial atenção por sua ação celular.⁴⁶

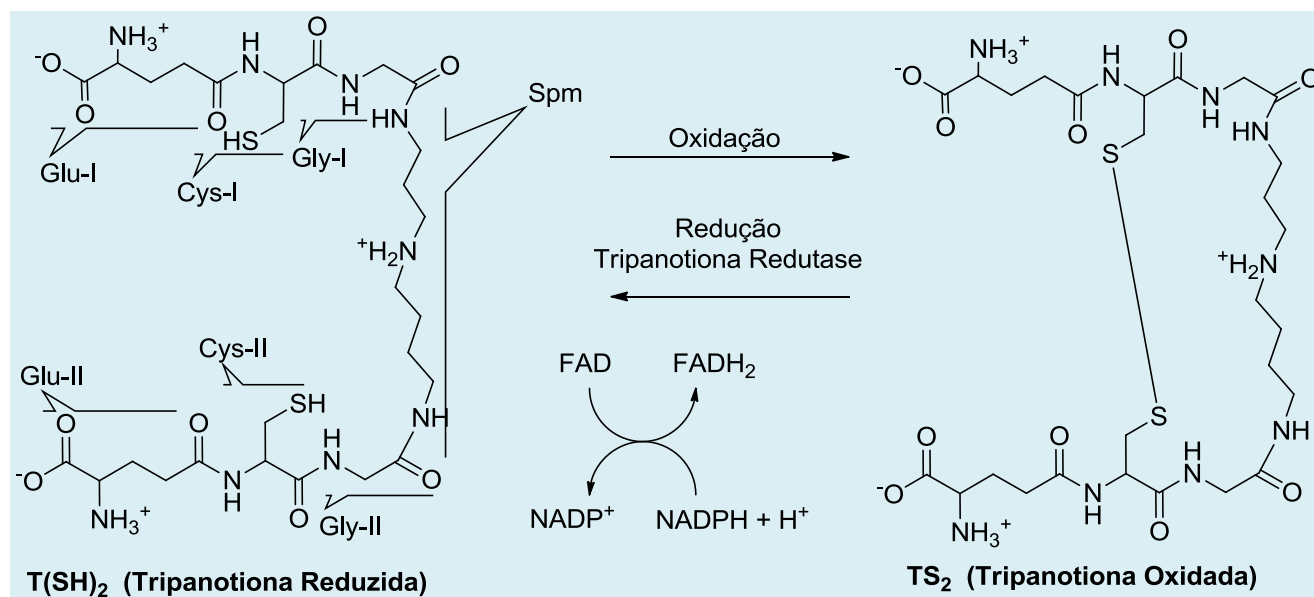


Figura 4. Reação de redução catalisada pela enzima Tripanotiona Redutase (TR)⁵

4.1. A enzima Tripanotiona Redutase

Seguindo-se ao isolamento da tripanotiona (TS₂),⁴⁷ foi observada atividade enzimática nos extratos de um parasito de insetos, *C. fasciculata*, que catalisava, de modo dependente de NADPH, a conversão da TS₂ (tripanotiona oxidada) à sua forma reduzida T(SH)₂ (tripanotiona reduzida, Figura 4).⁴⁸ Em 1986,⁴⁹ a enzima Tripanotiona Redutase (TR) foi purificada, caracterizada e comparada à enzima homóloga, Glutathiona Redutase, presente em seres humanos.⁴⁸

Estudos recentes³⁰ mostram que o sistema Tripanotiona Redutase-tripanotiona (TR/TS₂) encontra-se presente em outros organismos tão distintos dos tripanossomatídeos como as algas verdes flageladas (*Euglena gracilis*) e as amebas patogênicas (*Entamoeba histolitica* e *Naegleria fowleri*).

Estudos de Biologia molecular^{50,51} auxiliados por análises de Genética Molecular^{52,53} mostraram que os parasitos que possuem uma deficiência nas proteínas da via de síntese da TS₂ não se desenvolvem adequadamente num meio contendo espécies oxidantes.^{52,53}

4.1.1. a relação entre Tripanotiona Redutase e Glutathiona redutase

Desde 1980, a Glutathiona Redutase (GR) tem sido extensivamente estudada por Schulz e colaboradores.⁵⁴ Assim, várias informações foram obtidas sobre sua estrutura e função. A função de proteção celular desempenhada nos seres humanos pela glutathiona (GSH) é substituída, nos parasitos, pela tripanotiona reduzida (T(SH)₂), a qual sob estresse oxidativo é convertida à tripanotiona (TS₂, Figura 4). De modo análogo ao sistema humano, a TS₂ é reciclada à T(SH)₂ pela enzima Tripanotiona Redutase (TR), tendo como cofator NADPH (Figura 4). Estas analogias no mecanismo de catálise e na estrutura dos respectivos substratos tornaram o sistema Glutathiona Redutase-glutathiona (GR/GSH) um modelo inicial de estudo do complexo enzimático presente nos tripanossomatídeos.

Embora pertençam à família das dissulfeto óxido-redutases,⁵⁵ ambas as enzimas, GR e TR, apresentam elevada afinidade, alta eficiência catalítica e **exclusividade** por seus respectivos substratos, *i. e.*, a TR tem seletividade por TS₂, em detrimento da glutathiona, enquanto que a GR é seletiva para a glutathiona, em detrimento de TS₂.⁴⁶ Outras

semelhanças estruturais são apresentadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Esta exclusividade em relação aos substratos é observada, a despeito de ambas as enzimas apresentarem sítios ativos relativamente

conservados.⁵⁶ A **Figura** revela a sequência primária das estruturas da TR de diversos organismos e da GR humana, onde os resíduos substituídos permitem maior acomodação do TS₂ e da glutatona, respectivamente.

Tabela 2. dados estruturais e cinéticos das enzimas glutatona redutase de *Homo sapiens* (GR) e tripanotona-redutase (TR) de *T. cruzi*⁴⁶

Dados	GR	TR
Classificação	Piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidoreductase (Classe I)	
Coenzima	Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	
Doador de elétrons	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido (NADPH)	
Estrutura oligomérica	Homodímero	
Subunidade Mr (excluindo FAD)	52 500 u.m.	53 900 u.m.
Nº de aminoácidos por subunidade	478	492
Substrato natural	Dissulfeto de glutatona (GSSG)	Dissulfeto de tripanotona (TS ₂)
Reação catalisada	NADPH + GSSG → NADP+ + 2GSH	NADPH + TS ₂ → NADP+ + T(SH) ₂
K _M (µM, valores absolutos) ^a	65 (GSSG)	45 (valores de 55 e 50 já relatados) (TS ₂)
K _{cat} (min ⁻¹) ^b	12 600 (GSSG)	14 200 (TS ₂)
K _{cat} /K _M (M ⁻¹ seg ⁻¹) ^c	3,1x10 ⁶	5,3x10 ⁶
K _M ^{app} (NADPH) ^d	9	5

- a) K_M representa a afinidade da enzima pelo substrato.
- b) K_{cat} representa o número de reações que a enzima consegue converter seu respectivo substrato em cada sítio ativo a cada ciclo.
- c) k_{cat}/K_M representa a eficácia catalítica da enzima.
- d) K_M^{app} (NADPH) representa a afinidade da enzima pelo NADPH.

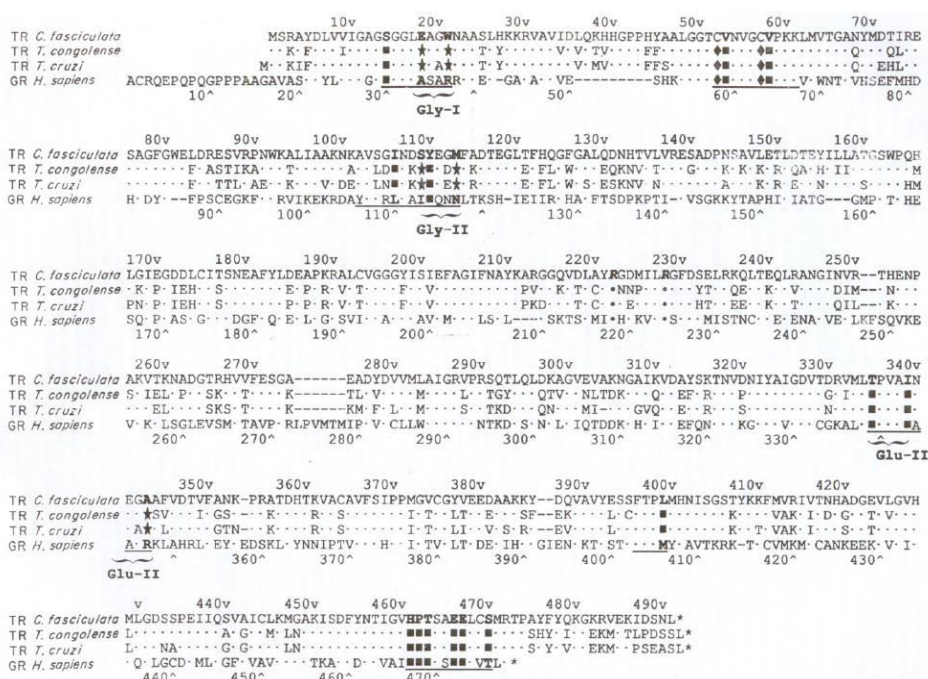


Figura 5. Alinhamento sequencial múltiplo entre as estruturas primárias da glutatona redutase humana (GR *H. sapiens*) e da tripanotona redutase (TR) dos tripanossomatídeos *C. fasciculata*, *T. brucei congolense* e *T. cruzi*. em negrito estão mostrados Os resíduos que interagem com os substratos enzimáticos; resíduos idênticos ou

homólogos na GR e TR são apresentados em quadrados preenchidos; as substituições não conservativas entre TR e GR são representando por estrelas⁵⁵

Devido a sua função catalítica semelhante, estas enzimas possuem uma identidade de 41% em relação a sequência de aminoácidos⁴⁸ (Figura 5). Sabe-se que dos **19** resíduos de aminoácidos relacionados à ligação com a glutationa na GR, **14** são idênticos (ou homólogos) aos resíduos relacionados à ligação da TR com a TS₂⁵⁷ (Figura 5). Deste modo, seria esperado que a quimioterapia planejada para a inibição da TR também afetasse a GR. Contudo, uma análise pormenorizada comparando-se os sítios ativos pode revelar o porquê dessa especificidade frente ao substrato e da seletividade frente aos compostos testados na terapia.

Uma comparação entre a superfície de potencial eletrostático nos sítios ativos da GR e da TR mostra que a GR apresenta resíduos que caracterizam um sítio ativo mais positivo e hidrofílico do que o da TR (Figura 6). Por outro lado, a TR tem um sítio mais espaçoso (20 Å de comprimento, 15 Å de profundidade e 15 Å de largura) e com uma região

hidrofóbica adjacente ao resíduo E19⁵⁵⁻⁵⁷. Essas características fazem com que a GR tenha atração eletrotática por seu substrato natural que é menos volumoso, mais hidrofóbico e que tem carga total igual a -2, mas que tenha repulsão eletrostática pela tripanotiona (TS₂) que é mais volumosa, mais hidrofílica e que tem carga igual a +1 (Figura 4), substrato natural da TR.⁵⁷ A figura 6 ilustra a superfície de potencial eletrostático calculada para as enzimas TR e GR.

Na Tabela 3 estão listados os resíduos de aminoácidos que compõem os sítios ativos da TR e da GR. O TS₂ pode ser dividido esquematicamente em sete monômeros (Figura 4, Glu-I, Cys-I, Gly-I, SPM, Gly-II, Cys-II, Glu-II, Figura 7 e Tabela 3) que, no sítio ativo da TR, interagem principalmente com: S15, W22, V54, V59, I107, S110, Y111, T335, I339, H461', P462', T463', S464', E466' e E467'.⁵⁷ As principais interações entra as isoformas GR e TR com seus respectivos substratos estão mostradas na Figura 7.

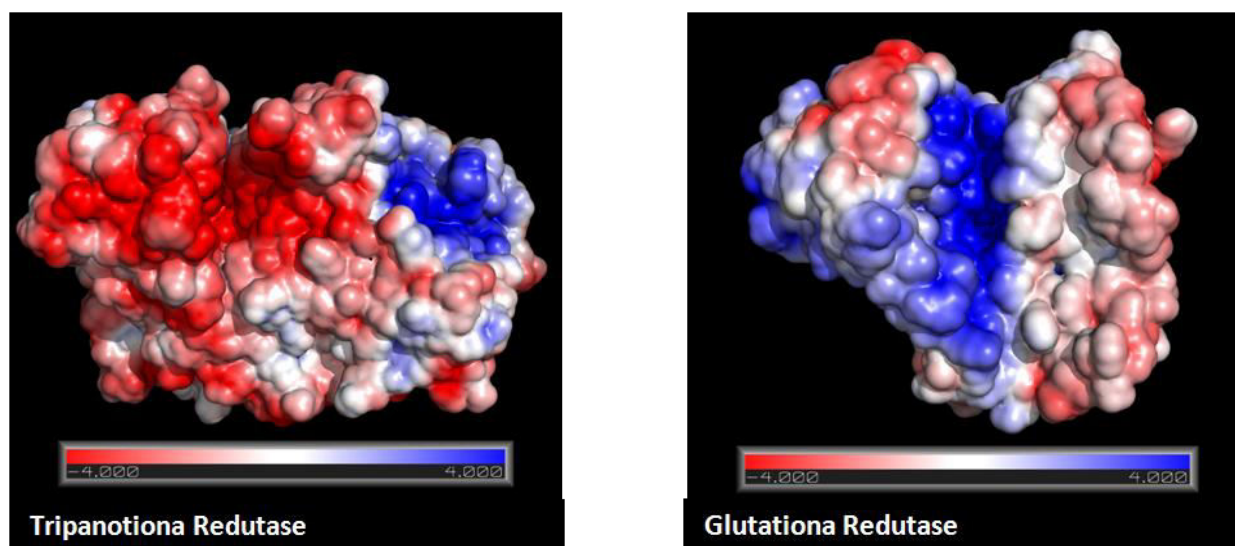


Figura 2: Representação da superfície de potencial eletrostático calculado pelo programa *apbs*⁵⁸ das enzimas tripanotiona redutase (esquerda) e glutationa redutase (direita). O sítio ativo encontra-se na fenda da região central das figuras

Tabela 3. Resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da glutatona redutase (GR) de *H. sapiens* e da tripanotona redutase (TR) de *T. cruzi*. os resíduos diferentes nos sítios ativos das enzimas do parasito (TR) e da isoforma humana (GR) são mostradas em negrito^{55,57}

Resíduos da GR <i>H. sapiens</i>	Resíduos do Substrato ^(a)	Resíduos da TR <i>T. cruzi</i>
Thr339, Ile343 , Arg347, His467' , Thr476'	γ -Glu-I	Pro336, Ile339, Gly459', His461, Glu466'
Ser30 , Cys58, Val59, Val64, Tyr114 , His467'	Cys-I	Val54, Tyr111, Thr335, Ile339, His461'
Ala34, Arg37, Tyr114	Gly-I	Ser15, Leu18, Tyr111, Ile339
-	Spm	Leu17, Glu18, Trp22, Ser110, Tyr111
Lys67 , Met406', His467' , Pro468 , Thr469' , Glu472' , Glu473'	γ -Glu-II	Val54, Val59, Lys62, Phe396, Lys399, His461', Pro462', Thr463', Ser464', Glu466', Glu467'
Leu110, Tyr114 , His467'	Cys-II	Val59, Ile107, His461'
Ile113, Tyr114 , Asn117	Gly-II	Ile107

(a) A ordem da sequência das cadeias do substrato segue a sequência apresentada na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

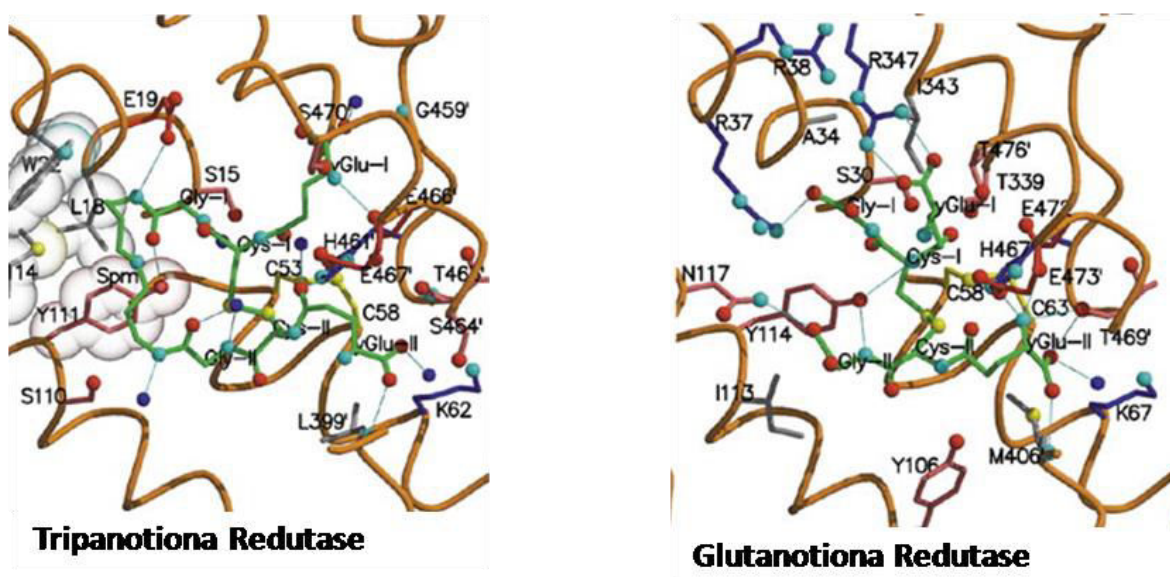


Figura 7. comparação das interações nos sítios ativos entre substratos e enzimas. no Sítio ativo da TR ligada ao TS₂ mostram-se as superfícies de Van der Waals de alguns resíduos hidrofóbicos da TR (esquerda). as principais interações no sítio ativo da GR ligada ao GSH estão reveladas na figura da direita⁵⁷

No cristal de TR da *C. fasciculata*, a cadeia espermidina interage com uma parte do sítio ativo que compreende os resíduos W21 e M113.⁵⁴ Neste complexo, a M113 participa de interações de van der Waals com o substrato e o W21 localiza-se sobre a cadeia espermidina auxiliando nos contatos entre

enzima e substrato numa extremidade do sítio ativo.⁵⁴ A estrutura da Tripanotona Redutase de *T. cruzi* (Figura 7), quando comparada com o modelo de *C. fasciculata*, reforçou⁵⁶ que esta região hidrofóbica é útil na ligação das cadeias hidrofóbicas do substrato, havendo uma complementaridade de carga entre

enzima e ligante, que se estende para regiões além do sítio.

Relatou-se ainda que a flexibilidade da cadeia lateral do W22 pode auxiliar no planejamento de inibidores, juntamente com as interações de van der Waals com os resíduos I107 e Y111⁵⁶ (Figura 7). Ademais, esta comparação também revelou que a região hidrofóbica, formada pelos resíduos L18, W22, Y111 e M114⁵⁷ (Figura 7), interage com a cadeia alifática do substrato (Spm, Figura 4) e oferece uma complementaridade de carga para além desta região do sítio.⁵⁶ Esta região hidrofóbica foi acessada por inibidores fenotiazínicos⁵⁹ e, recentemente, ressaltou-se a interação do tipo cátion- π entre a TS₂ e os resíduos hidrofóbicos (L18, W22, Y111 e M114) sendo a maior contribuição hidrofóbica oriunda da M114.⁵⁷

De posse das informações provenientes da estrutura do complexo TR/TS₂ em alta resolução⁵⁷ e conhecendo-se profundamente um modelo biológico análogo (GR/GSH), o estudo de inibidores seletivos para a TR visando o adequado tratamento das tripanossomíases foi impulsionado.

4.1.2. Compostos Químicos testados contra a *Tripanotona Redutase*

As abordagens mais recentes para o desenvolvimento de fármacos cujo alvo seja o sistema *Tripanotona Redutase/Tripanotona* dos parasitos baseiam-se em três principais vertentes:³⁶

- 1º. O planejamento de inibidores da TR com base na estrutura do substrato. Estes seriam responsáveis pela depleção das espécies protetoras contra a oxidação das células (conhecidos como “substratos subversivos”);
- 2º. O desenvolvimento de espécies que formem radicais livres ou espécies que sejam capazes de sequestrar ou oxidar a *tripanotona* (TS₂) intracelular. Espécies formadoras de radicais livres ligam-se ao sítio ativo da TR e sofrem redução pelo NADPH gerando com O₂ intracelular, ânions radicais superóxidos.⁵ Exemplos de fármacos dessa classe com aplicação na terapêutica antiparasitária atual são o nifurtimox e o benzonidazol (Figura 3).
- 3º. O planejamento de inibidores específicos que possam impedir a formação do dímero da TR uma vez que se sabe que cada subunidade proteica isolada é inativa⁶⁰ e que sua forma

ativa é dimérica. Para tal ação, derivados peptídicos podem, em princípio, agir como inibidores alostéricos impedindo o enovelamento proteico, evitando a união dos monômeros, ou ainda, atuando como inibidores competitivos em relação ao substrato,⁶⁰ o que pode afetar o decurso do processo patológico não atingindo as manifestações crônicas da doença de Chagas.⁶⁰

Tomando a seletividade do sistema TR/TS₂ como fator importante, o estudo de estruturas similares ao substrato natural, diferindo apenas no número de ligações dissulfeto do sistema cíclico, demonstrou que a existência de uma ponte dissulfeto (Figura 4) ou trissulfeto é capaz de alterar o mecanismo de catálise da TR, mas não o seu modo de ligação.⁶¹ O estudo de uma outra série de análogos da TS₂, variando a extensão das cadeias poliaminas (Spm, Figura 4) e as extremidades das cadeias γ -glutamil-cisteínas (γ -Glu-Cys, Figura 4), demonstrou que a TR possui uma pequena preferência por espermidinas e que além disso, são tolerados análogos aromáticos.⁶²

A determinação experimental da estrutura do complexo *Tripanotona Redutase/Tripanotona*⁵⁷ e a busca por inibidores com estrutura similar ao substrato natural permitiram que alguns produtos naturais fossem testados. Como exemplo, tem-se a lunarina.⁵⁷ As conclusões deste trabalho, aliadas a estudos realizados com inibidores tricíclicos,^{59,63-65} apontam o mecanismo proposto de inibição, onde as extremidades catiônicas dos inibidores interagem com dois resíduos de glutamato da TR (E466' e E467', Figura 7), enquanto que o sistema cíclico hidrofóbico interage com os resíduos de F^{396'}, P^{398'} e L^{399'} (Figura 7).

O estudo da interação do nitrogênio quaternário de derivados fenotiazínicos com os E466' e E467' da TR resultou na descrição do sítio formado pelos resíduos de H461', E466' e E467'⁵⁹ (Figura 7). Estudos usando derivados alquil-amônio quaternários⁶⁵ revelaram que o sítio possui a capacidade de interagir com inibidores carregados positivamente. Este sítio possui o resíduo catalítico do sítio ativo com capacidade de doar/aceitar o próton catalítico, a H461', cujo anel imidazol (N δ 1) forma uma ligação hidrogênio com o E466' (O ϵ 1).⁵⁷ O resíduo E467' possui o papel de neutralizar o positivo sítio ativo da TR⁵⁴ conforme revelado no mecanismo da reação de catálise (Figura 8).

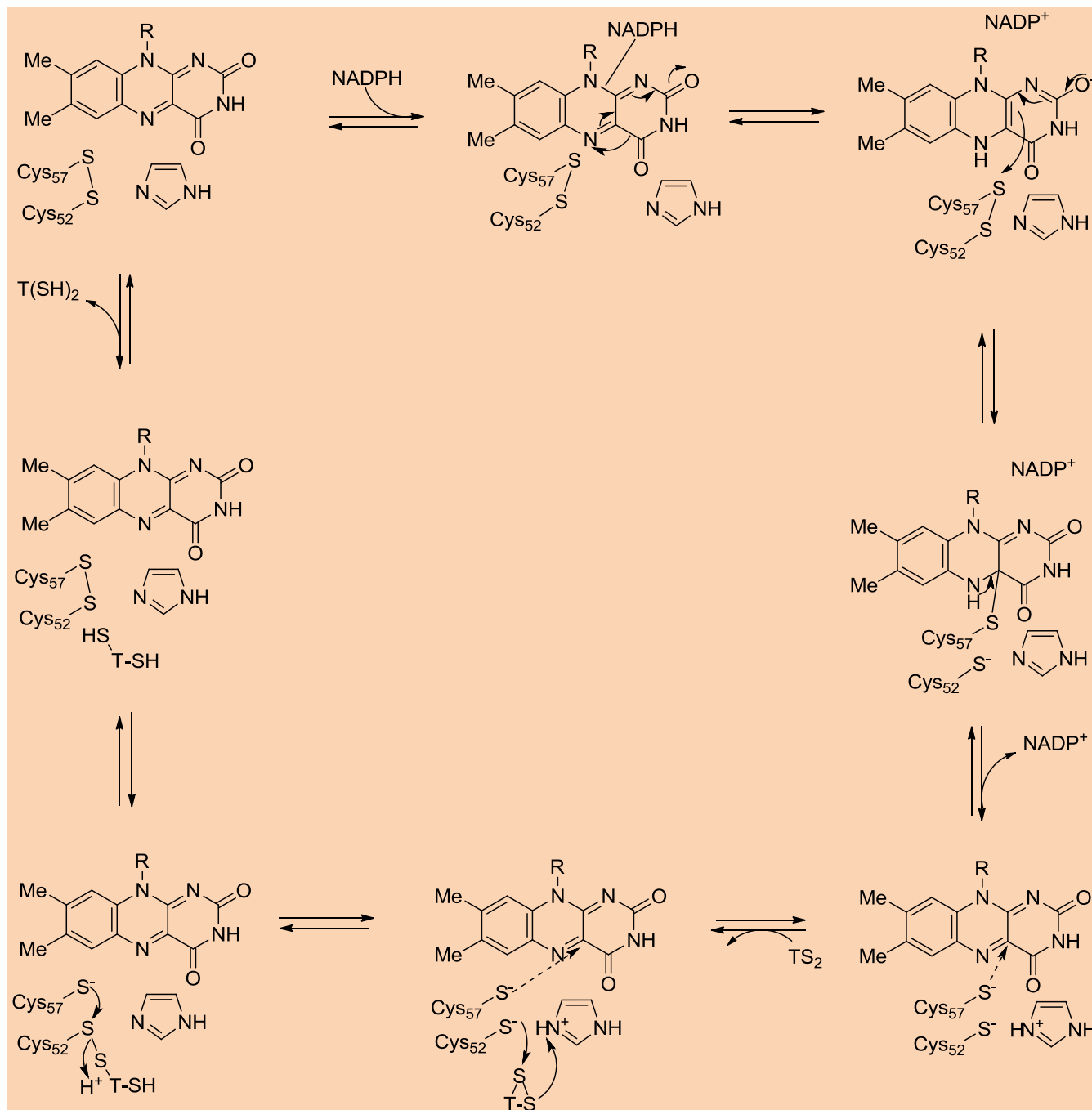


Figura 8. Mecanismo químico proposto para a catálise enzimática da Tripanotona Redutase⁶⁶

O estudo cinético com derivados clorpromazínicos carregados⁶⁷ revelou que uma cadeia lateral carregada positivamente é importante na especificidade da TR e que este grupo interage com região idêntica a da espermidina do substrato (próximo ao resíduo de W22 no sítio ativo, Figura 7). Assim, é aceito que os inibidores possam ter carga positiva para interagir com resíduos específicos da TR.

O desenvolvimento de peptídeos ou de análogos de peptídeos (*i.e.*, peptídeo miméticos) que mimetizem a estrutura do substrato natural da TR, apresenta-se como um campo promissor para o desenho de novos fármacos que levem a

desestabilização da proteína-alvo ou bloqueio da sua atividade catalítica. Assim, uma série de derivados peptídicos foram sintetizados e testados *in vitro* para inibir, de modo competitivo e seletivo em relação ao substrato, a TR,⁶⁸ apresentando valores de atividade inibitória de 13,8 μM , no caso do composto mais ativo, *Benzoil-Leu-Arg-Arg- β -naftilamida*.^{68,69}

Posteriormente, foram avaliados outros peptídeos que não têm similaridade com a estrutura da TS₂, mas que possuem diferentes resíduos de aminoácidos igualmente ativos para a enzima, dos quais dois peptídeo miméticos apresentaram, *in vitro*, valor de inibição igual a 2,4 μM .⁶⁹ Usando, *in vitro*, derivados peptídeo miméticos não-hidrolizáveis (peptídeos)

obteve-se inibição da TR variando de 10 a 300 μm .⁷⁰ Essas informações indicam a possibilidade de abordagens racionais promissoras resultarem no desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas uma vez que o *Trypanosoma cruzi* depende da enzima TR para o seu metabolismo.

4.2. Outros Alvos Enzimáticos do *T. cruzi*

Com o sequenciamento genômico⁴³ e proteômico³³ do *T. cruzi* e outros estudos

bioquímicos,⁶ vieram à luz diversos alvos biológicos promissores para o desenvolvimento de novos protótipos contra o parasito, como: algumas organelas celulares exclusivas; certas rotas metabólicas, algumas presentes também em outros organismos; e, em sua grande maioria, as enzimas. Nesta classe inclui-se, além do sistema TR/TS₂, aquelas envolvidas na síntese de poliaminas,⁴⁴ as topoisomerases, a *trans*-sialidase e a prolina racemase.⁶ Na Tabela 4 alguns destes alvos biológicos são apresentados.

Tabela 4. principais vias bioquímicas exploradas no desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas⁴

Rota Metabólicas	Alvos
Proteases	Cisteíno-proteases, Serino-proteases, Metaloproteínas e Treonino-proteases
Biossíntese de esteróis	Esterol 14-demetilase, Lanosterol sintase, Esqualeno epoxidase, Esqualeno sintase, D-24(25) esterol metiltransferase, 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, Farnesilpirofosfato sintase e Farnesiltransferase
Via glicolítica	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Hexoquinase, Fosfofrutoquinase
Biossíntese de lipídeos	Alquil-lisofosfolipídeos e Glicosfingolipídeos
Metabolismo dependente de grupos tióis	Tripanotiona Redutase , Tripanotiona Sintetase e Triparedoxina peroxidase
Metabolismo de pentose fosfato	6-Fosfogluconato desidrogenase
Super família de proteínas quinases	Arginina quinase e Fosfatidilinositol-3 quinase
Transporte e metabolismo de poliaminas	Arginina descarboxilase e Glutacionil espermidina sintetase
Síntese de nucleotídeos	Purina fosforibosil transferases, Di-hidrofolato redutase, Pteridina redutase e Di-hidro-orotato desidrogenase
Organelas celulares	Núcleo e cinetoplasto, Mecanismo de transporte de Na ⁺ /H ⁺ , Componentes da membrana e osmorregulação, Glicosomo e síntese de vitamina C
Transferência de ácido siálico	<i>Trans</i> -sialidase
DNA topoisomerases	DNA topoisomerase I e DNA topoisomerase II

Uma vertente baseia-se na inibição das proteases do parasito como a cruzaina (ou cruzipaina), esta enzima, pertencente a classe das cisteíno-proteases e possui a maior atividade proteolítica durante os estágios de vida dos parasitos.^{6,37,71} Contra este alvo, diversas classes de compostos peptídicos,^{4,37} não-peptídicos,^{4,37} organometálicos,⁴ dentre outros,⁴ foram testados. Enzimas envolvidas na glicólise

parasitária (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e hexoquinase), no ciclo das pentoses, na síntese de nucleotídeos e na captação de purinas (hipoxantina guanina fosforibosil transferase e di-hidrofolato redutase) foram também analisadas frente a diversas classes de inibidores.⁶

As enzimas da biossíntese do ergosterol (Tabela 4) representam um dos sistemas mais estudados e

prolíficos na quimioterapia da doença de Chagas.^{72,73} Esta via metabólica é responsável pela produção de componentes da membrana celular sendo o ergosterol, o principal esteroide no *T. cruzi*.⁴ Resultados de inibição desta via têm alcançado a fase de triagem clínica como candidatos a fármacos anti-*T. cruzi*⁴ e diversos outros alvos dos múltiplos passos dessa rota bioquímica⁶ continuam a serem estudados. A primeira enzima dessa rota biossintética, a hidroximetilglutaril coenzima-A redutase, é encontrada na mitocôndria dos parasitos e foi inibida experimentalmente por estatinas.^{6,74} Outras enzimas da rota, tais como farnesilpirofosfatase sintetase; esqualeno sintetase e esqualeno epoxidase; oxidoesqualeno ciclase; esteroide 14-demetilase e Δ -24 esteroide metiltransferase são alvos farmacológicos estudados.^{6,37} O potencial dos compostos desta classe pode ser observado ao se notar que dois inibidores enzimáticos induziram a cura parasitológica em modelos animais de infecção aguda e crônica.^{75,76}

Estes parasitos flagelados possuem uma estrutura única, chamada cinetoplasto, a qual armazena a rede de DNA mitocondrial. Esta região consiste de dois tipos circulares de DNA: maxi-círculos e mini-círculos.^{6,77} Como os mini-círculos apresentam muitas sequências AT, o DNA do cinetoplasto tornou-se um alvo potencial para a terapia farmacológica.⁶ Enzimas como as DNA topoisomerases I e II desempenham um papel essencial na replicação do DNA de *T. cruzi* e, o planejamento de inibidores para estas isomerasas, tem atraído a atenção da comunidade científica resultando em alguns agentes quimioterápicos citotóxicos.⁴

Diversas outras proteínas, como aquelas envolvidas na síntese de lipoproteínas,³⁷ ou as envolvidas na transferência de ácido siálico entre o hospedeiro e o parasito (a *trans*-sialidase), ou enzimas que participam da produção de ATP através de a via glicolítica⁴ surgiram como alvos na busca de fármacos contra o *T. cruzi* (Tabela 4).

A degradação intracelular de proteínas nos organismos eucarióticos é executada por um complexo multi enzimático de proteases denominado de proteossomo,³⁷ o qual difere significativamente do sistema encontrado nos parasitos. Assim, alguns inibidores de proteossomos parasitários com estruturas químicas análogas a peptídeos também foram testados.³⁷

5. Conclusões

Uma vez que os investimentos para a pesquisa em doenças tropicais negligenciadas são escassos, as parcerias entre institutos de pesquisa, governos e órgãos de fomento são de vital importância para a contínua busca de um ponto final ao sofrimento dos milhares de pessoas afligidas por treze das principais enfermidades tropicais. Resultados frutíferos de parcerias intergovernamentais como as apresentadas pela **Iniciativa do Cone Sul** ainda carecem de um aporte maior e um contínuo fluxo de recursos.

A fim de debelar a doença de Chagas muito esforços foram envidados, tanto na área de pesquisa básica quanto na pesquisa clínica. Neste, deve-se reforçar o estudo de medicamentos cujas ações há muito são conhecidas e, naquele campo, o auxílio por modernas técnicas de estudo, descobriram promissores alvos terapêuticos.

Contudo, após 102 anos da descoberta da doença de Chagas, nenhum princípio ativo chegou ao cabo de seu desenvolvimento. Os trabalhos de Carlos Chagas terão mera valia histórica caso as pesquisas para uma terapia efetiva contra o protozoário não evolua para o desenvolvimento de um produto acabado com reduzidos efeitos adversos, quer seja este uma vacina, quer seja um fármaco.

Referências Bibliográficas

- ¹ Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S. E.; Sachs, J. D.; Savioli, L. N. *Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Mandavilli, A. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Renslo, A. R.; McKerrow, J. H. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2444. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Linares, G. E.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Soeiro, M. N.; de Castro, S. L. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Morris, K. *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 468. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Bethony, J. M.; Cole, R. N.; Guo, X.; Kamhawi, S.; Lightowlers, M. W.; Loukas, A.; Petri, W.; Reed, S.;

- Valenzuela, J. G.; Hotez, P. J. *Immunol. Rev.* **2011**, *239*, 237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Coura, J. R.; de Castro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Dias, J. C.; Silveira, A. C.; Schofield, C. J. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 603. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Fraser, B. *Lancet* **2008**, *372*, 16. [[CrossRef](#)]
- ¹² Dias, J. C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Igreja, R. P. *Lancet* **2009**, *373*, 1340. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Molyneux, D. H. *Lancet*, **2004**, *364*, 380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Cardoso, A. V.; Lescano, S. A.; Amato Neto, V.; Gakiya, E.; Santos, S. V. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2006**, *48*, 287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Tatto, E.; Menezes, J. A.; Kitagawa, B; Freitas, D. C.; Dimech, G. S.; Wada, M. Y.; Obara, M. T.; Madeira, A.; Zeccher, S.; Laupert, F.; Aguiar, M.; Steindel, M.; Hatch, D. L.; *56th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Philadelphia, Estados Unidos, 2007.
- ¹⁷ Nóbrega, A. A.; Garcia, M. H.; Tatto, E.; Obara, M. T.; Costa, E.; Sobel, J.; Araujo, W. N. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Camandaroba, E. L.; Pinheiro Lima, C. M.; Andrade, S. G. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2002**, *44*, 97. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Jackson, Y.; Myers, C.; Diana, A.; Marti, H. P.; Wolff, H.; Chappuis, F.; Loutan, L.; Gervais, A. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Salinas, A. D. G. M.; Fernández-Guerrero, M.; *17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Munich, Alemanha, 2007.
- ²¹ Lescure, F. X.; Canestri, A.; Melliez, H.; Jaureguiberry, S.; Develoux, M.; Dorent, R.; Guiard-Schmid, J. B.; Bonnard, P.; Ajana, F.; Rolla, V.; Carlier, Y.; Gay, F.; Elghouzzi, M. H.; Danis, M.; Pialoux, G. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² de-Ayala, A. P.; Perez-Molina, J. A.; Norman, F. Lopez-Velez, R. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Bern, C.; Montgomery, S. P. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, e52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Gonzalez-Granado, L. I.; Rojo-Conejo, P.; Ruiz-Contreras, J.; Gonzalez-Tome, M. I. *Lancet* **2009**, *373*, 2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Gontijo, E. D.; Santos, S. E., Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>>. Acesso em: 15 Abril 2004.
- ²⁶ Editorial *Lancet* **2009**, *373*, 1820. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Chagas, C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1909**, *1*, 159. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Andrade, L. O.; Andrews, N. W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Jannin, J.; Villa, L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 95. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Tyler, K. M.; Engman, D. M. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31*, 472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Kollien, A. H.; Schaub, G. A. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 381. [[CrossRef](#)]
- ³³ Atwood, J. A. 3rd; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. *Science* **2005**, *309*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Pudukollu, G.; Gowda, R. M.; Khan, I. A.; Navarro, V. S. Vasavada, B. C. *Int. J. Cardiol.* **2007**, *115*, 279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Cerecetto, H.; Gonzalez, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Moreira, D. R.; Leite, A. C.; dos Santos, R. R.; Soares, M. B. *Curr. Drug. Targets* **2009**, *10*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Steverding, D.; Tyler, K. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Santos, R. R.; Soares, M. B. P.; Carvalho, A. C. C. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2004**, *37*, 490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Soares, M. B. P.; Lima, R. S.; Rocha, L. L.; Takyia, C. M.; Pontes-de-Carvalho, L.; de Carvalho, A. C. C.; Ribeiro-dos-Santos, R. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Goldenberg, R. C. S.; Jelicks, L. A.; Fortes, F. S. A.; Weiss, L. M.; Rocha, L. L.; Zhao, D.; de Carvalho, A. C.; Spray, D. C.; Tanowitz, H. B. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Soares, M. B. P.; dos Santos, R. R. *Cien. Saude Colet.* **2008**, *13*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Vilas-Boas, F.; Feitos, G. S.; Soares, M. B. P.; Mota,

- A.; Pinho-Filho, J. A.; Almeida, A. J. G.; Andrade, M. V.; Carvalho, H. G.; Dourado-Oliveira, A.; Ribeiro-dos-Santos, R. *Arq. Bras. Cardiol.* **2006**, *87*, 159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasc, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. *Science* **2005**, *309*, 409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M. *Amino Acids* **2007**, *33*, 359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Muller, I. B.; das Gupta, R.; Luersen, K.; Wrenger, C.; Walter, R. D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *160*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Fairlamb, A. H.; Cerami, A. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. *Science* **1985**, *227*, 1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Walsh, C.; Bradley, M.; Nadeau, K. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Kelly, J. M.; Taylor, M. C.; Smith, K.; Hunter, K. J.; Fairlamb, A. H. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Dumas, C.; Ouellette, M.; Tovar, J.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Tamar, S.; Olivier, M.; Papadopoulou, B. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Krieger, S.; Schwarz, W.; Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rev. Virtual Quim.* |Vol 3| |No. 4| |307-324|
- ⁵³ Allaoui, A.; François, C.; Zemzoumi, K.; Guilvard, E.; Ouaisi, A. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Bailey, S.; Smith, K.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Hunter, W. N.; Bailey, S.; Habash, J.; Harrop, S. J.; Helliwell, J. R.; Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K.; Fairlamb, A. H. *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 322. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁶ Zhang, Y.; Bond, C. S.; Bailey, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Bond, C. S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Structure* **1999**, *7*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 10037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Chan, C.; Yin, H.; Garforth, J.; McKie, J. H.; Jaouhari, R.; Speers, P.; Douglas, K. T.; Rock, P. J.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Fairlamb, A. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Schirmer, R. H.; Muller, J. G.; Krauthsiegel, R. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 141. [[CrossRef](#)]
- ⁶¹ Moutiez, M.; Aumercier, M.; Parmentier, B.; Tartar, A.; Sergheraert, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1245*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Marsh, I. R.; Bradley, M. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Benson, T. J.; McKie, J. H.; Garforth, J.; Borges, A.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Biochem. J.* **1992**, *286*, 9. [[PubMed](#)] [[Link](#)]
- ⁶⁴ Garforth, J.; Yin, H.; McKie, J. H.; Douglas, K. T.; Fairlamb, A. H. *J. Enzyme Inhib.* **1997**, *12*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Khan, M. O.; Austin, S. E.; Chan, C.; Yin, H.; Marks, D.; Vaghjiani, S. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Douglas, K. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Leichus, B. N.; Bradley, M.; Nadeau, K.; Walsh, C. T.; Blanchard, J. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Faerman, C. H.; Savvides, S. N.; Strickland, C.; Breidenbach, M. A.; Ponasik, J. A.; Ganem, B.; Ripoll, D.; Krauth-Siegel, R. L.; Karplus, P. A. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Garforth, J.; McKie, J. H.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Amino Acids* **1994**, *6*,

295. [\[CrossRef\]](#)

⁶⁹ McKie, J. H.; Garforth, J.; Jaouhari, R.; Chan, C.; Yin, H.; Besheya, T.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Amino Acids* **2001**, *20*, 145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷⁰ Chan, C.; Yin, H.; McKie, J. H.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Amino Acids* **2002**, *22*, 297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷¹ Sant'Anna, C.; Parussini, F.; Lourenco, D.; de Souza, W.; Cazzulo, J. J.; Cunha-e-Silva, N. L. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 1187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷² Urbina, J. A. *Curr. Opin. Infect Dis.* **2001**, *14*, 733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷³ Urbina, J. A.; Docampo, R. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 495. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷⁴ Florin-Christensen, M.; Florin-Christensen, J.; Garin, C.; Isola, E.; Brenner, R. R.; Rasmussen, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166*, 1441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷⁵ Apt, W.; Aguilera, X.; Arribada, A.; Perez, C.; Miranda, C.; Sanchez, G.; Zulantay, I.; Cortes, P.; Rodriguez, J.; Juri, D. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *59*, 133. [\[PubMed\]](#) [\[Link\]](#)

⁷⁶ Hucke, O.; Gelb, M. H.; Verlinde, C. L.; Buckner, F. S. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5415. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷⁷ Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)